ISSN [e] 2244-8888

Pittieria
43
ENERO-DICIEMBRE 2019 *págs. 60-79*

AVANCES EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES A TRAVÉS DEL SISTEMA BASADO EN VECTORES VIRALES DE PLANTAS

ADVANCES IN THE RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION THROUGH PLANT VIRAL VECTOR-BASED SYSTEM

por

ARNALDO M. NOGUERA A.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales in vitro, Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales,
Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela.
a.noguera@ula.ve

RECIBIDO: JUNIO 15 DE 2019 / **ACEPTADO:** NOVIEMBRE 20 DE 2019

RESUMEN

La expresión de proteínas heterólogas a través del uso de vectores de virus de plantas representa una estrategia novedosa, rápida, inocua y de bajo costo. No obstante, la mejora permanente de estos sistemas de producción de péptidos recombinantes exige una actualización constante en relación a los diferentes aspectos que determinan el uso de este tipo de productos biológicos. Por ejemplo, propiedades físico-químicas tales como estabilidad térmica, solubilidad, equilibrio ácido, hidrofobicidad, farmacocinética, tasa de eliminación sistémica, plegamiento; otras características como antigenicidad, afinidad por sus ligandos cognados, digestión enzimática y modificaciones post-traduccionales, son algunas de las cualidades que se deben considerar para expresar correctamente una proteína biológicamente funcional. De estas propiedades, la glicosilación, un tipo de modificación post-traduccional común en todas las células eucarióticas, ha tenido especial interés debido a las diferencias en los patrones de glicosilación observados entre plantas y animales. Por esta razón, se presenta una breve revisión con la cual se busca abordar no sólo los logros que la glicobiología ha permitido obtener en el campo de la producción de péptidos heterólogos, sino también de los trabajos más relevantes alcanzados a través de la tecnología de las VLPs.

PALABRAS CLAVE: Agricultura molecular, expresión transitoria, glicobiología, proteínas heterólogas,

ABSTRACT

The expression of heterologous proteins through plant virus vectors-use represents a novel, fast, innocuous and low cost strategy. However, the permanent improvement of these recombinant peptide production systems demands a constant update in relation to the different aspects that determine the use of this type of biological products, for example, physicochemical properties such as thermal stability, solubility, acid equilibrium, hydrophobicity, pharmacokinetics, systemic elimination rate, folding; other characteristics such as antigenicity, affinity for its related ligands, enzymatic digestion and post-translational modifications, are some of the qualities that must be considered to correctly express a biologically functional protein. Of these properties, glycosylation, a type of post-translational modification common in all eukaryotic cells, has been of special interest due to differences in glycosylation patterns observed between plants and animals. For this reason, a brief review is presented which seeks to address not only the achievements that glycobiology has allowed to obtain in the area of heterologous peptide production, but also from the most relevant works achieved through VLPs technology.

KEY WORDS: Molecular farming, transient expression, glycobiology, heterologous proteins.

INTRODUCCIÓN

La agricultura molecular de plantas a través de la implementación de las nuevas tecnologías de la biología molecular, ha dado pasos agigantados durante los últimos años que han hecho posible el desarrollo de compuestos biológicos importantes con aplicaciones médicas. Biofármacos tales como anticuerpos, sustitutos de productos sanguíneos, vacunas, hormonas, citokinas y una gran variedad de otros agentes terapéuticos se han expresado a través de múltiples sistemas biológicos especialmente diseñados para producir esta clase de moléculas fisiológicamente activas.

Por otra parte, estos sistemas de expresión heteróloga en plantas están siendo empleados para solventar muchos de los problemas relacionados con otros sistemas convencionales de expresión de proteínas; como por ejemplo, la ausencia de la maquinaria involucrada con la modificación pos-traduccional en bacterias, lo que dificulta la producción de proteínas multiméricas complejas en este tipo de sistema (Marusic *et al.* 2007), la glicosilación incorrecta que se observa cuando se emplean células de levaduras que con frecuencia originan proteínas hipo o hiperglicosiladas y repercuten sobre su funcionamiento, la demanda de complejas plataformas de expresión necesarias para realizar el cultivo de células de insectos y mamíferos o el uso de animales transgénicos (Verch *et al.* 1998), aunado al hecho de que estas instalaciones requieren de un alto nivel de bioseguridad para evitar posibles focos de infección por proteínas contaminadas con toxinas, priones o virus que afectan animales (Ma *et al.* 2003).

En este sentido, el constante crecimiento de las nuevas estrategias de expresión de péptidos heterólogos en plantas, ha incrementado el interés de la empresa farmacéutica privada por las diferentes plataformas de producción de proteínas recombinantes en dichos sistemas. Dentro de estas plataformas la que más auge tiene actualmente a nivel mundial es la que se apoya en los vectores de virus de plantas, y en una adaptación de ésta denominada tecnología de las VLPs o *Virus-Like Particles* por sus siglas en inglés.

Algunas ventajas que ofrecen estos últimos sistemas incluyen, alto rendimiento de proteínas libres o no fusionadas al virión quimérico, integración estable de la secuencia foránea dentro del genoma del virus pero no dentro del genoma vegetal (por lo que limita su heredabilidad), amplificación del gen foráneo por la replicasa viral, capacidad de replicación de los virus en un amplio rango de especies vegetales, máximo rendimiento alcanzado entre uno a tres meses una vez que la planta es inoculada con el virus quimérico, bajo costo de producción, y gran aceptación como método de expresión transitoria sobre cualquier otro sistema que emplea plantas "*in vivo*" como medio de producción.

Un aspecto importante de considerar, cuando se emplean estos sistemas de expresión heteróloga, es la complejidad de las modificaciones post-traduccionales propias de las células eucariotas, tales como la *N*-glicosilación, la *O*-glicosilación, el establecimiento de puentes disulfuros y el control del plegamiento proteico, características que son de necesario cumplimiento para reproducir la estructura nativa de las glicoproteínas. En este sentido, se presenta la siguiente revisión bibliográfica con la cual se busca recabar la información más relevante, disponible y accesible, relacionada con el uso actual de los vectores de virus de plantas como herramientas biotecnológicas para la producción de proteínas recombinantes.

ESTADO ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS RECOMBINANTES BASADA EN VECTORES DE EXPRESIÓN VIRAL

Los vectores de expresión viral de plantas son herramientas biotecnológicas que permiten realizar estudios de caracterización funcional de genes de interés, debido a su capacidad para producir proteínas recombinantes a gran escala y de manera rápida (Kagale *et al.* 2012). Actualmente este tipo de vectores basados en genomas virales goza de gran auge en laboratorios de investigación, empresas farmacéuticas y laboratorios de biotecnología comercial, por la forma en cómo han permitido soslayar muchas de las dificultades que acompañan al resto de los sistemas de expresión de péptidos heterólogos. Por ejemplo, la ausencia de la maquinaria de modificación post-traduccional en los sistemas procarióticos que limitan la producción de proteínas multiméricas complejas (Marusic *et al.* 2007), la hiperglicosilación de péptidos en células de levaduras que con frecuencia generan proteínas con baja estabilidad estructural, la demanda de complejas plataformas de expresión, los elevados costos de producción y las estrictas medidas de seguridad que requieren los sistemas basados en el cultivo de células de insectos o mamíferos y en el uso de animales transgénicos (Verch *et al.* 1998). Esto explica el vertiginoso crecimiento que ha experimentado la agricultura molecular basada en la producción de proteínas recombinantes farmacológicamente útiles en plantas superiores (Badri *et al.* 2009).

Este sistema de expresión híbrido, conformado por una parte por la planta hospedera, quien funge como el biorreactor donde se producen, ensamblan y almacenan los péptidos heterólogos, y por otra parte el vector viral encargado de transportar y entregar el constructo genético que se desea expresar; ofrece soluciones para algunos de los problemas relacionados con los sistemas convencionales. Por ejemplo, ausencia de riesgo de contaminación con patógenos de humanos como virus o priones (Ma *et al.* 2003), bajo costo de producción (especialmente para la producción a gran escala), alto rendimiento de la proteína foránea, anticuerpos ensamblados apropiadamente o con un plegamiento proteico equivalente al encontrado en otros sistemas eucarióticos, posibilidad de expresar anticuerpos "humanizados", expresión de vacunas multicomponentes en un mismo tejido u órgano vegetal, facilidad de manejo de plantas en invernadero, rápida distribución de plantas a escala mundial, posibilidad de producir vacunas comestibles para la vacunación masiva y producción de péptidos altamente inmunogénicos.

El primer intento en el desarrollo de vectores virales de plantas incluyó el uso de virus con genomas de ADN; sin embargo, la complejidad de los ciclos de replicación de esta clase de virus los hace incompatible para alcanzar altos niveles de expresión de la proteína foránea (Cañizares *et al.* 2005). Por tal motivo, la mayoría de los vectores virales emplea virus que poseen genomas de ARN bicatenario o monocatenario con polaridad positiva. En este sentido, la expresión de proteínas a través de este sistema aprovecha la fácil manipulación de los clones de ADN complementario de virus vegetales con genomas de ARN simple banda (Cañizares *et al.* 2005, Komarova *et al.*, 2010) y la capacidad que poseen los transcritos virales modificados para ser traducidos directamente en células vegetales aisladas o en plantas completas.

Inicialmente se diseñaron dos sistemas básicos de expresión basados en vectores virales que se encuentran ubicados dentro del grupo de los vectores de primera generación. El primero de ellos denominado "*Sistema de expresión de*

polipéptidos", se emplea para expresar proteínas recombinantes completas no fusionadas que se acumulan dentro de la planta, y el segundo conocido como "*Sistema de presentación de epítopes*", en el cual el vector viral es diseñado de forma tal que un péptido antigénico corto es fusionado a la cubierta proteica del virión y posteriormente es desplegado sobre la partícula del virión ensamblado (Yusivob *et al.* 1997, Marusic *et al.* 2001, Donini *et al.* 2005; Noguera & Fermín 2013). Este último sistema ha servido de base para desarrollar una plataforma conocida como "*Virus-Like Particles*" o VLPs, la cual permite desarrollar vacunas para muchas de las patologías que afectan actualmente al hombre. La tecnología de las VLPs permite producir en un corto período de tiempo viriones no infectivos; es decir, partículas virales desprovistas de su ácido nucleico, pero ensambladas apropiadamente expresando sobre su cubierta la secuencia completa de un péptido inmunogénico, un anticuerpo o una vacuna. Algunos ejemplos de la aplicación de esta reciente tecnología, denominada VLPExpressTM y ProficiaTM, son el desarrollo de una vacuna cuadrivalente que está diseñada para contrarrestar los embates ocasionados a nivel mundial por la cepa H1N1 del virus de la influenza (estudio fase III), la producción de una vacuna candidata contra la raza H5N1 (estudio en fase II) y una vacuna trivalente contra las razas H1N1, H3N2 e influenza virus B (estudio fase II), responsables de muchas de las influenzas estacionales (Pillet *et al.* 2016, MEDICAGO, 2018).

Adaptaciones posteriores en el uso de la tecnología de los vectores de expresión viral de primera generación, incluyen el uso de versiones deconstruidas de sus genomas (Hefferon 2012). Esta modalidad consiste en un sistema de vectores binarios en el que el genoma viral se encuentra repartido entre dos plásmidos y la secuencia codificante del gen de interés está asociada al gen de la proteína de cápside viral que se ubica en uno de los episomas (FIGURA 1). Las ventajas principales de esta aproximación son, aumento de la estabilidad del gen foráneo dentro del constructo, rapidez en la expresión del péptido heterólogo y alta producción de un gran número de proteínas farmacéuticas recombinantes, algunas de las cuales se encuentran actualmente en evaluación clínica (Peyret & Lomonossoff 2015). Esta estrategia experimental que define a los vectores virales de segunda generación, surge para dar respuesta a las limitaciones relacionadas con la replicación del genoma viral, la inestabilidad del constructo ocasionada por el tamaño del gen de interés, los problemas asociados a algunas funciones indeseadas del vector que se desean eliminar, con la necesidad de añadir o reubicar funciones que no derivan directamente del virus, o simplemente para delegar funciones que son necesarias y que pueden ser proporcionadas por la célula hospedera (Gleba *et al.* 2004).

Actualmente se encuentran disponibles versiones deconstruidas para algunos virus de ARN que infectan plantas dicotiledóneas, dentro de ellos se ubican el virus del mosaico del tabaco (*Tobamovirus*), el virus x de la papa (*Potexirus*), el ARN-2 del virus del mosaico del caupí (*Comovirus*), el virus sonajero del tabaco (*Tobravirus*) y el virus enanizante amarillo del tabaco (*Mastrevirus*). En referencia a las especies de virus con genomas deconstruidos que infectan plantas monocotiledóneas se pueden señalar al virus enanizante del trigo, al virus del rayado del maíz (ambos del género *Mastrevirus*, Familia *Gemiviridae*), y al virus del mosaico de la cebada (*Hordeivirus*) (Peyret & Lomonossoff 2015). De igual forma se encuentran accesibles en diversos laboratorios a nivel mundial las versiones de genoma completo de

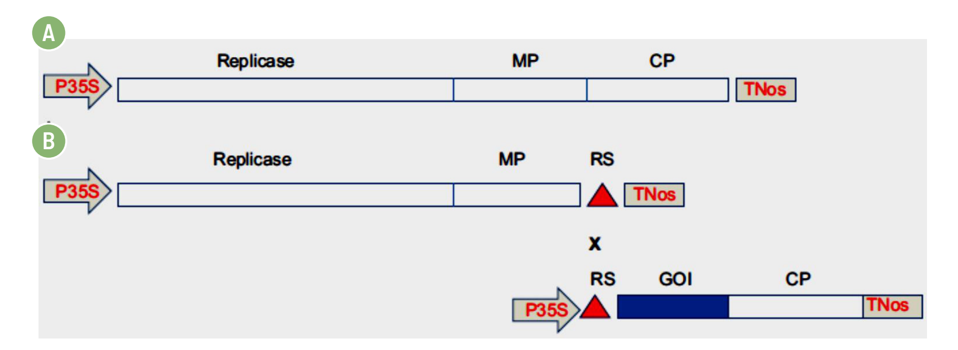


FIGURA 1. Representación esquemática de las versiones completa (A) y deconstruida (B) de un vector de expresión basado en el genoma del virus del mosaico de tabaco (TMV). Se muestran la ubicación de los genes de la replicasa viral, la proteína de movimiento (MP), la proteína de cápside (CP), los sitios de recombinación específica (RS), el promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (P35S) y la secuencia de terminación de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (TNos). Cuando se utiliza un virus deconstruido (b), los dos módulos se recombinan por los sitios RS dentro del núcleo y se restablece la secuencia completa del vector quimérico (Hefferon, K., Virology 433, 1-6 (2012) doi: 10.1016/j.viro.2012.06.012).

muchos de estos vectores; por ejemplo, dentro de los más utilizados hasta el presente se encuentran el virus del mosaico del caupí (*CPMV*), el virus del mosaico del pepino (*CMV*), el virus del mosaico de la alfalfa (*AMV*), el virus arbustivo enanizante del tomate (*TBSV*), el virus de la viruela del ciruelo (*PPV*), el virus x de la papa (*PVX*), el virus del mosaico del tabaco (*TMV*), el virus de la necrosis del tabaco (*TNV*), el virus del mosaico amarillo del calabacín (*ZYMV*) y, más recientemente, el virus de la tristeza de los cítricos (*CTV*) que infecta plantas leñosas (FIGURA 2) (Folimonov *et al*. 2007, Lico *et al*. 2012).

Otras mejoras al sistema de vectores virales de segunda generación involucran cambios en el método de inoculación o entrega de los vectores modificados a la planta hospedera. Esta estrategia, conocida como "magnifección" o MagnICONTM (Icon Genetics, Halle, Alemania), utiliza un sistema híbrido entre los vectores virales y el mecanismo de infección de la bacteria patógena de plantas *Agrobacterium tumefaciens* (Hooykaas & Schilperoort 1992, Valderrama *et al*. 2005, Komarova *et al*. 2010, Husk *et al*. 2014). La expresión transitoria de la proteína foránea se logra luego de realizada la agroaspersión o agroinfiltración de dos módulos separados conformados por el genoma de un vector de expresión viral deconstruido, los cuales son ensamblados dentro de la célula vegetal utilizando la información genética y la maquinaria metabólica de *Agrobacterium* para generar un replicón viral funcional (Hefferon *et al*. 2012, Lico *et al*. 2012, Klimyuka *et al*. 2014).

Una aproximación experimental posterior emplea un vector basado en el genoma del TMV que carece de la secuencia codificante de la proteína de cápside (Kagale *et al*. 2012). Esta última modificación genera un incremento de cien veces la acumulación de la proteína recombinante, lo que a su vez se ve favorecido por el método de inoculación vía agroaspersión ya mencionado (FIGURA 3). Adicionalmente, se reubica el marco de lectura del gen foráneo más cerca del extremo 3` del replicón viral, con la finalidad de proporcionarle más estabilidad al inserto, y se añade la secuencia codificante de la proteína supresora del silenciamiento viral P19 del virus enanizante del tomate (TBSV), au-

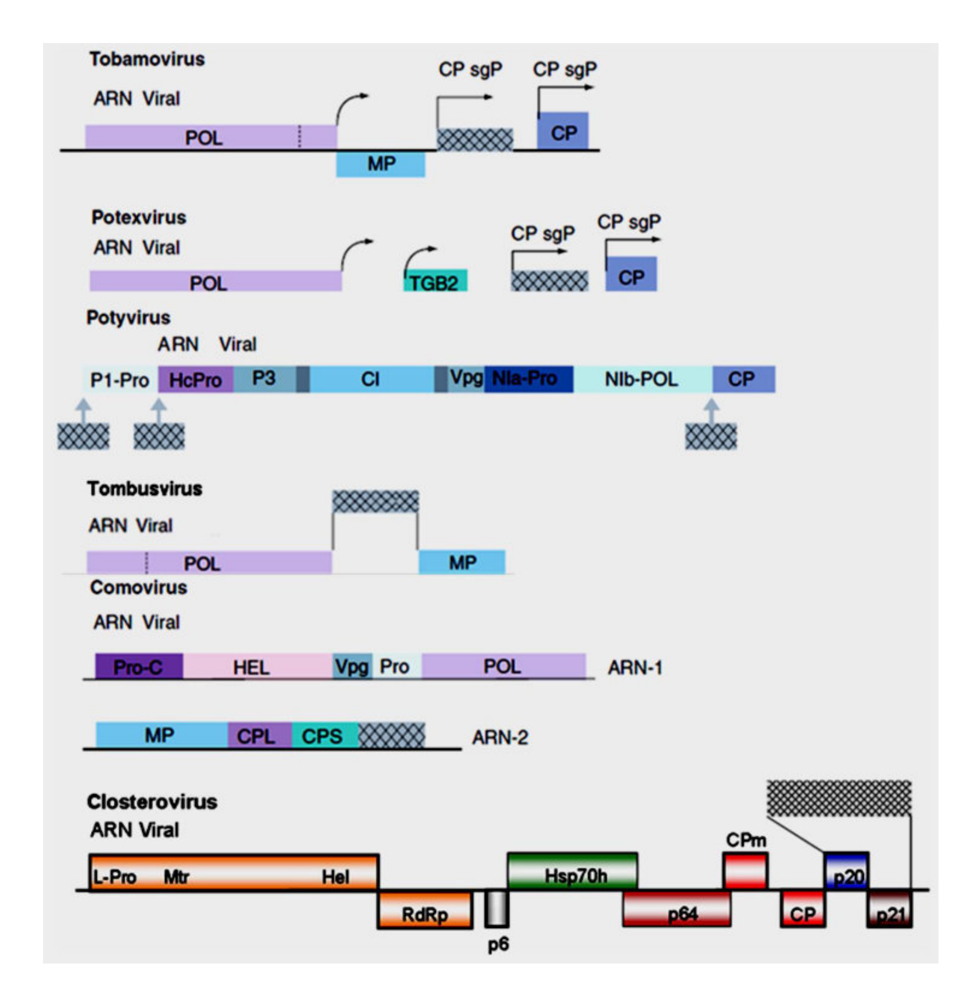


FIGURA 2. Organización genómica de los virus de plantas utilizados para expresar proteínas recombinantes. Las posiciones donde se insertan los genes de interés se identifican con cajas de líneas entrecruzadas. Las funciones de algunos genes se detallan a continuación. POL/RdRp: ARN polimerasa dependiente de ARN, MP: proteína de movimiento, CP: proteína de cápside, sgP: promotor sub-genómico, TGB: bloque triple de genes, P1-Pro: proteasa P1, HcPro: componente auxiliar de la proteasa, CI/HEL: helicasa, VPg: proteína viral de anclaje/cebadora, Pro: proteasa, Pro-C: cofactor de proteasa, CPL: proteína de cápside grande, CPS: proteína de cápside pequeña, L-Pro: secuencia líder de la proteasa, Mtr: metiltransferasa, Hsp: gen homólogo de la proteína de choque térmico, CPm: proteína menor de cápside (Noguera Arnaldo & Fermín Gustavo, *Avances en Biomedicina*, 2(3), 137-53 (2013).

mentando así la producción del péptido heterólogo entre 10 y 25 veces su cantidad.

El resto de los cambios realizados a los vectores de segunda generación involucran, el uso del sistema de clonación GatewayTM para facilitar la recombinación sitio-específica, alteración del uso de codones para aumentar la eficiencia de la replicasa viral (RdRp), adición de intrones propios de plantas dentro de la secuencia codificante de la RdRp y de la proteína de movimiento para evitar su clivaje, y finalmente la remoción de sitios de "splicing" del transcrito primario.

Alcances más recientes de la expresión de proteínas recombinantes en plantas, utiliza la sobreexpresión mediada por vectores basados

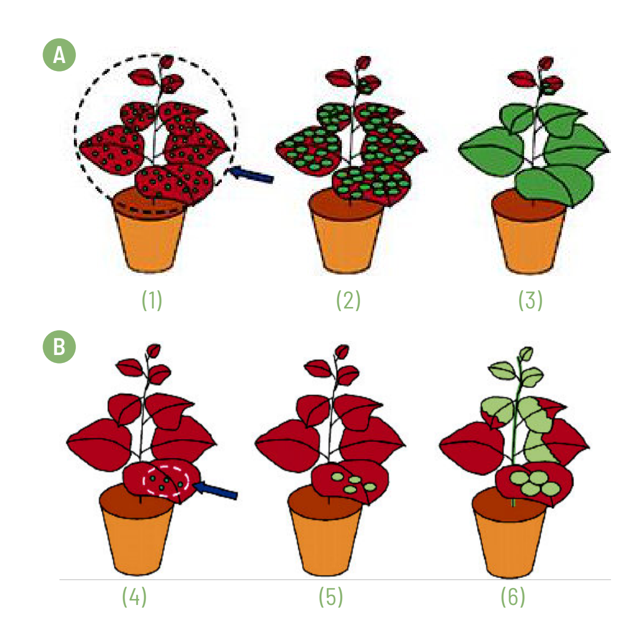
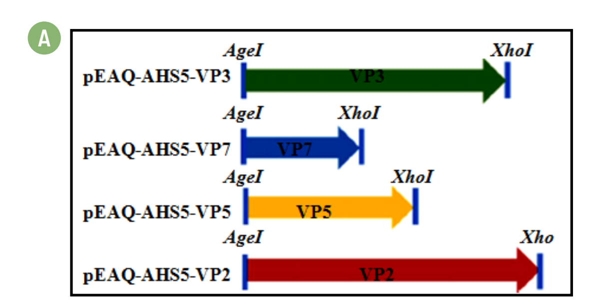


FIGURA 3. Representación esquemática de los mecanismos de inoculación-infección mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (A) y por vectores de virus de plantas (B). En (A) se observa un modelo de inoculación a través del método de agroaspersión de un vector viral deconstruido desprovisto de la proteína de cápside (1), y la posterior infección generalizada que ocurre gracias al movimiento intercelular vía plasmodesmos del genoma viral quimérico (2 Y 3). En (B) se representa la inoculación localizada con ARN modificado de un vector viral de genoma completo (4) y su consecuente infección a corta distancia que es dependiente de la proteína de movimiento a través de plasmodesmos (5) y la infección sistémica vía tejido de conducción (floema) mediada por la proteína de cápside (6).

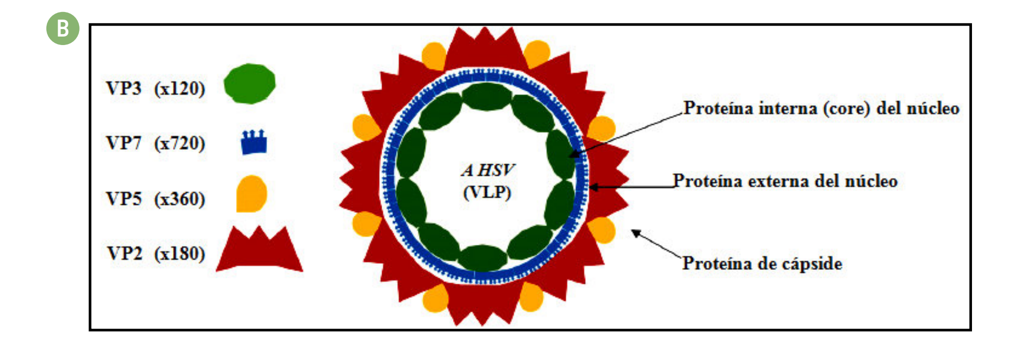
en los virus del mosaico rayado de la cebada (*BSMV*) y del mosaico rayado del trigo (*WSMV*) (Bouton *et al.* 2018). Este trabajo enmarca la inclusión en las tecnologías de expresión de péptidos heterólogos, a diversas especies de cereales cultivadas y no cultivadas (malezas) como por ejemplo, el maíz, el trigo, el sorgo, la cebada y algunas especies de malezas como *Setaria viridis* y *S. italica*.

De igual forma se han introducido mejoras en el sistema de expresión transitoria mediada por *A. tumefaciens* que permiten producir múltiples polipéptidos recombinantes de manera simultánea a partir de un único constructo viral. Estas proteínas que son expresadas de forma no fusionada pueden posteriormente ser ensambladas dentro de la célula vegetal, en una única estructura multicomponente con mayor nivel de complejidad. Algunos ejemplos de esta aplicación fueron reportados por Thuenemann *et al.* (2013) y Dennis *et al.* (2018), quienes desarrollaron VLPs de los *Orbivirus* causantes de la lengua azul (*BTV*) y de la enfermedad del caballo africano (*AHSV*) respectivamente, para lo cual emplearon las cuatro proteínas que componen sus cubiertas proteicas (FIGURA 4). Este proceso, considerado por los autores de estos trabajos como biológicamente funcional, rápido, simple, escalable y económicamente viable; fue ejecutado usando la familia de vectores virales pEAQ basado en el genoma del virus del mosaico del caupí (*CPMV-HT, HT: HyperTransfer*), y cuyo sistema fue diseñado inicialmente por Sainsbury *et al.* (2009).

A



B



C D

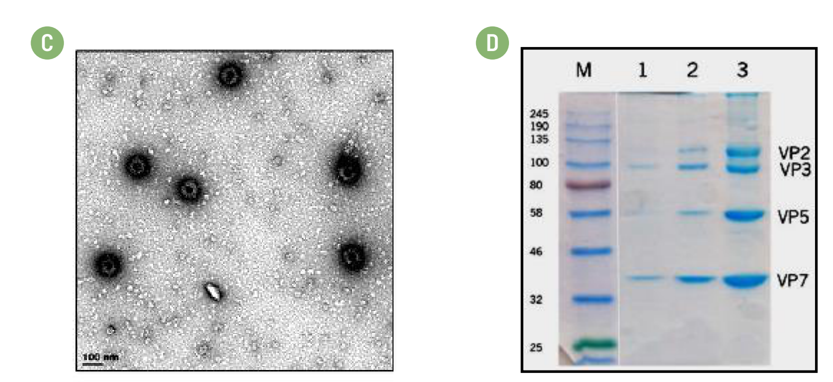


FIGURA 4. Representación esquemática de los constructos creados a partir de la familia de vectores pEAQ para expresar las proteínas estructurales del *Orbivirus* causante de la enfermedad del caballo africano (AHSV), serotipo 5. (A) Estructura de los genes codificantes de las proteínas estructurales VP2, VP3, VP5 y VP7 del AHSV, se destacan los sitios de restricción empleados para realización la ligación al vector pEAQ-HT. (B) Diagrama estequiométrico de las proteínas VPs y la forma en cómo se ensamblan en partículas como virus (VLP). (C) VLPs provenientes de extracto foliar de plantas de *N. benthamiana* y observadas a través de microscopía electrónica de transmisión. (D) Separación de las proteínas VPs mediante SDS-PAGE seguido por tinción con azul de Coomassie. 1, 2 y 3 representan tres fracciones diferentes de extractos foliar crudo purificadas por gradiente de densidad (Dennis Susan, *et al.*, *Plant Biotechnology Journal* 16(2): 442-50 (2018), doi: 10.1111/pbi.12076).

Con este mismo enfoque se construyeron un grupo de vectores denominados pEff, con el que se han producido simultáneamente múltiples antígenos a partir de un solo evento de ligación-expresión. El sistema pEff consta de un vector de 13 kilobases fabricado empleando elementos genéticos del PVX, y el cual fue utilizado para estandarizar la producción de una vacuna candidata constituida por el ectodominio de la proteína de membrana M2 del virus de la influenza, fusionada al antígeno nuclear (core) del virus de la hepatitis B (Mardanova *et al.* 2017). Los resultados reportados en este ensayo demostraron la eficiencia y rapidez de este vector para producir antígenos recombinantes en plantas de *Nicotiana benthamiana* "*in vivo*". Estas últimas estrategias descritas acerca de la producción de vacunas multicomponentes o multiepítopes representan un avance significativo del trabajo inicialmente reportado por Verch *et al.* (1998), quienes utilizando el vector viral TMV30B lograron expresar y ensamblar en células de tabaco un anticuerpo monoclonal denominado CO17-1A, que está dirigido contra un tipo de antígeno de cáncer colorectal.

Por otra parte, se comenzaron a estandarizar estrategias de expresión basadas en vectores con genomas de ADN monocatenario. Una aplicación reciente de este sistema se logró utilizando elementos genéticos de los virus del rizado foliar del algodón (*CLCuMV*), del rizado foliar del tomate (*TYLCV*), así como de elementos virales satélites asociados a estos virus (Kachoie *et al.* 2018). A partir de este vector se construyeron quimeras virales portando el gen de la proteína de cápside p24 del VIH-1 en sustitución del elemento betasatélite C1 (βC1), que comúnmente se asocia con la replicación y el desarrollo de síntomas ocasionados por los dos Geminivirus mencionados previamente (Fauquet *et al.* 2005). Los resultados de este estudio permitieron determinar la expresión exitosa de p24 en plantas de *N. benthamiana* y *N. glutinosa* cuando éstas fueron inoculadas con el vector viral *CLCuMV* modificado; es decir, sustituyendo la secuencia de βC1 por la de p24. De esta forma se logró evidenciar la eficiencia que posee este vector de ADN para entregar genes foráneos en plantas y el efecto supresor del componente βC1 sobre la replicación genómica del vector *CLCuMV* y la expresión de péptidos heterólogos.

CONTROVERSIA ENTRE LOS PATRONES DE N-GLICOSILACIÓN Y O-GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN PLANTAS

Una consideración importante de los sistemas de expresión heteróloga de proteínas es la complejidad de las modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilación, fosforilación, metilación, acetilación, formación de puentes disulfuros y plegamiento, que son necesarias para reproducir la estructura nativa y biológicamente activa de las proteínas. En plantas, el retículo endoplasmático (RE) el cual es el compartimiento sub-celular que funciona como puerta de entrada a la vía secretora (Marusic *et al.* 2009), es el lugar de mayor importancia para que ocurran las reacciones de glicosilación y establecimiento de puentes disulfuros (Heleinius & Aebi 2001).

La razón por la cual la vía secretora de plantas ha sido ampliamente explotada para la producción de proteínas farmacéuticas importantes, radica en la mayor estabilidad que posee la proteína heteróloga cuando es almacenada en compartimientos sub-celulares donde predomina un ambiente oxidativo, pocas proteasas y baja actividad hidrolítica, características propias del RE (Ko *et al.* 2009, Marusic *et al.* 2009).

Además, este compartimiento puede tolerar alta acumulación de proteínas solubles sin comprometer el funcionamiento celular (Wandelt *et al.* 1992). No obstante, aun cuando el plegamiento que puedan sufrir las proteínas en el RE ha evolucionado para favorecer su estabilidad y actividad biológica, la retención en el lumen del RE de polipéptidos que naturalmente residen en el citosol puede cambiar su plegamiento y tener efectos adversos sobre su funcionamiento (Noguera & Fermín 2013). Esta consecuencia deriva básicamente de la diferencia existente entre los patrones de glicosilación de estos compartimientos.

Diversos trabajos han mostrado especial interés acerca de la divergencia en los pasos de glicosilación que ocurren en el Golgi medio y *trans* entre células de plantas y mamíferos (Hellwig *et al.* 2004, Ko & Koprowski *et al.* 2005). Aun cuando el patrón de glicosilacion que ocurre en residuos específicos de asparaginas (NXS/T) durante su paso por el lumen del RE y el Golgi *cis* es bastante conservado entre estos dos tipos celulares (Ko *et al.* 2009), el uso en humanos de muchas glicoproteínas de importancia terapéutica derivadas de plantas ha tenido aplicaciones limitadas. La desventaja principal de esta clase de proteínas recombinantes está asociado con el tipo de *N*-glicanos propios de células vegetales [β(1,2)-xilosa y α(1,3)-fucosa] que son añadidos a la estructura de las proteínas durante su desplazamiento por los compartimientos del Golgi medio y *trans* (FIGURA 5). Esto se debe básicamente a que los residuos de xilosil y fucosil sobre los complejos *N*-glicanos de plantas han demostrado ser el epítope clave responsable de la alergenicidad en humanos de este tipo de glicoproteínas (Doran 2000).

Dada la marcada plasticidad del proteoma de las plantas se han sugerido diversas estrategias para evitar la adición de los glicanos propios de células vegetales a los péptidos heterólogos. Por ejemplo, la co-expresión de múltiples proteínas que permitan manipular cuidadosamente la vía secretora en plantas para producir polipéptidos con patrones de glicosilación similar al que ocurre en mamíferos. Tal es el caso de la "humanización" de la maquinaria de glicosilación que busca expresar las enzimas β(1,4)–galactosiltransferasa y sialiltransferasa en plantas. Otras alternativas que se pueden implementar para soslayar la adición de los glicanos inmunogénicos de plantas incluyen, uso de péptidos señales propios de la vía secretora, maduración proteolítica a lo largo de la misma vía de producción, identificación y expresión de chaperonas moleculares que proporcionen estabilidad a la glicoproteína expresada, retención de la glicoproteína recombinante en el lumen del RE mediante la adición en el extremo C-terminal de la secuencia del hexapéptido señal "SE(H/K)DEL", para prevenir las glicosilaciones tardías específicas de células vegetales (Margolin *et al.* 2018). De igual forma se puede añadir la secuencia de la prolamina "γ-zein" del maíz, la cual permite formar cuerpos proteicos y acumularlos en altas cantidades en este compartimiento sub-celular (Marusic *et al.* 2009).

Contrariamente, y a pesar de las diferencias significativas de la *O*-glicosilación entre plantas y animales, la ingeniería genética vegetal ha estado enfocada en estrategias que utilizan deliberadamente los *O*-glicanos específicos de plantas sobre péptidos recombinantes (Webster & Thomas 2012). Este tipo de modificación consiste en la adición de oligosacáridos al oxígeno del grupo hidroxilo sobre la cadena lateral de los aminoácidos serina, treonina, hidroxilisina o hidroxiprolina, y su empleo se debe al amplio rango de características estructurales y funcio-

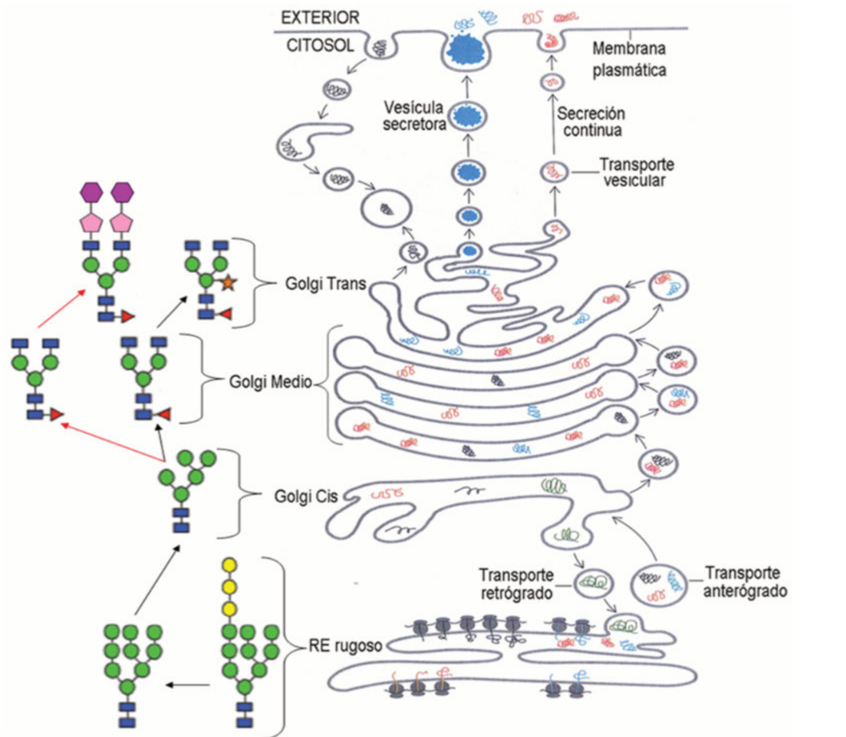




FIGURA 5. Patrón de glicosilación de proteínas en plantas y animales. Las proteínas recombinantes expresadas en plantas experimentan la adición de N-glicanos propios de células vegetales [α(1,3)-fucosa y β(1,2)-xilosa], los cuales son añadidos a su estructura durante el desplazamiento por los compartimientos del Golgi medio y *trans*. Nótese que las modificaciones post-traduccionales entre ambos tipos de células son iguales hasta el Golgi *Cis*. La ruta de glicosilación en células animales se indica con flechas rojas. Los polipéptidos destinados a permanecer en el lumen del retículo endoplasmático (RE) son marcados con la secuencia del tetrapéptido señal (K/H)DEL antes de ser exportados por primera vez desde el RE hacia el Golgi Cis (transporte anterógrado), lo cual permite que estos péptidos sean recuperados y devueltos al RE a través del transporte retrógrado (Noguera Arnaldo & Fermín Gustavo, *Avances en Biomedicina*, 2(3), 137-53 (2013).

nales que estos conjugados son capaces de afectar. En este sentido, diversos trabajos han propuesto que la *O*-glicosilación puede aumentar la estabilidad, el rendimiento y el comportamiento fármaco-cinético de muchas proteínas que tienen un tiempo de vida media muy corto (Xu *et al.* 2007, Xu *et al.* 2008, Tan *et al.* 2010).

En mamíferos la mayoría de los *O*-glicanos se forman en la vía secretora mediante la adición de *N*-acetilglucosamina en residuos de serina o treonina, mientras que en plantas los residuos de prolina son convertidos a hidroxiprolina (Hyp) por la actividad de la enzima prolil-4-hidroxilasa (P4H), los cuales son posteriormente conjugados con arabinosa originando una estructura que no está presente en mamíferos (FIGURA 6) (Montero & Steinkellner 2018). De esta forma, la principal limitación de los *O*-glicanos producidos en plantas es la presencia de residuos de Hyp que obstaculizan la modificación propia de mamíferos.

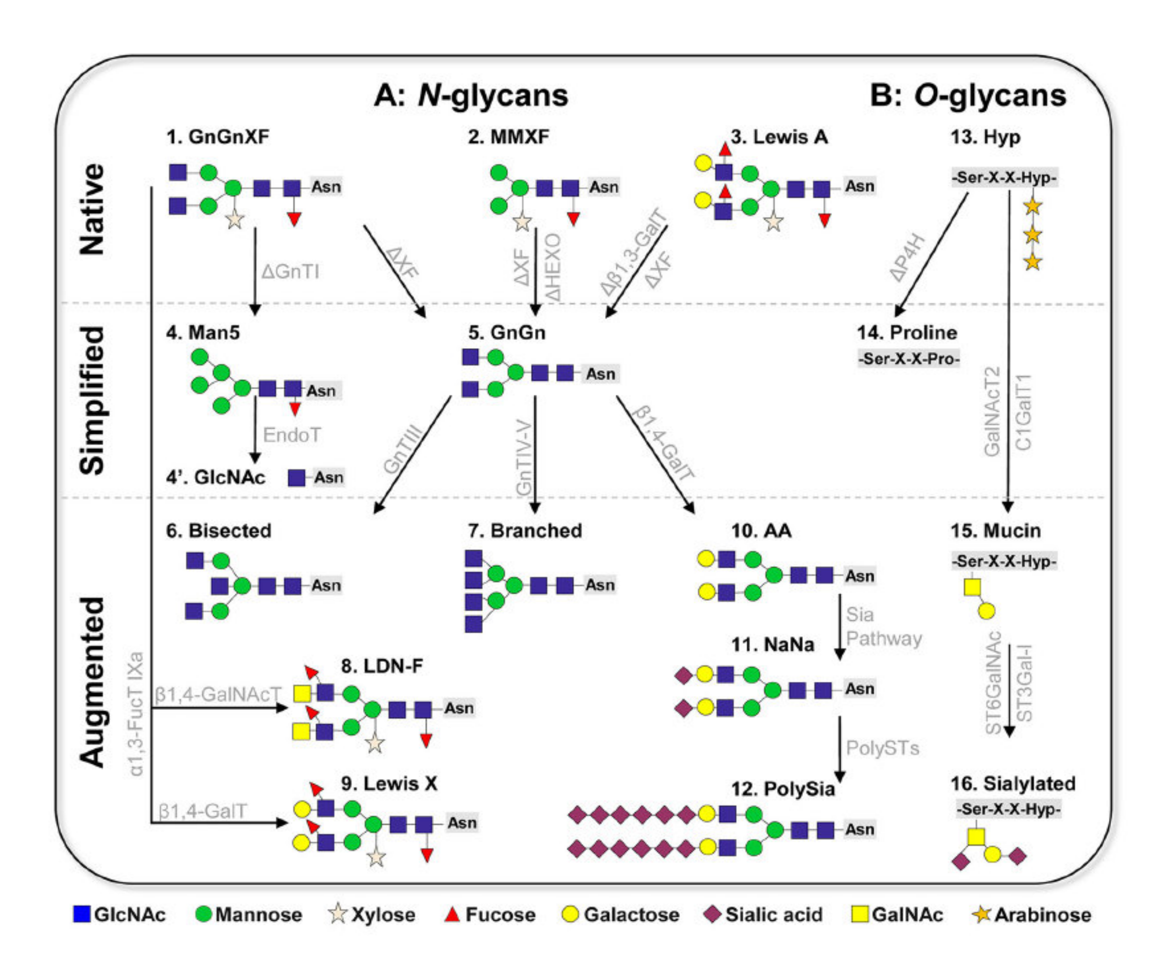


FIGURA 6. Representación esquemática del desarrollo de glicanos en células vegetales. (A) N-glicanos. Nativa: Las tres glicoformas principales frecuentemente detectadas en plantas silvestres son 1: GnGnXF, 2: MMXF, 3: Estructura de Lewis A. Simplificada: Simplificación de glicanos ocasionada por deleción 4: Man5, estructura generada por deficiencia de la N-acetilgucosaminiltransferasa I (GnTI), 4`: GlcNAc individual generada por clivaje, 5: GnGn (núcleo eucariótico común). Aumentada: Aumento de glicanos de plantas por sobreexpresión estable o transitoria de enzimas glicosilasas foráneas. 6: GnGnbi (estructura bifurcada), 7: ([GnGn])([GnGn]) (estructura ramificada), 8: LDN-F (estructura tipo helminto), 9: Estructura de Lewis X, 10: AA (estructura β-1,4 galactosiltranferasa), 11: NaNa (estructura α-2,6 sialiltransferasa), 12: PoliSia (estructura polisialidada). (B) O-glicanos. Nativa 13: Glicoforma nativa común (Hidroxiprolina "Hyp" conjugada con residuos de arabinosa). Simplificada 14: Prolina (deleción de la P4H para prevenir la conversión de prolina a Hyp). Aumentada 15: Mucina (sobreexpresión de la GalNAc transferasa-2 humana (GalNAcT2) y de la β-1,3-galactosiltransferasa de *Drosophila melanogaster* (C1GalT1), 16: Glicano sialidado (sobreexpresión de α-2,6 y α-2,3 sialiltransferasa (ST6GalNAc y ST3Gal-I) (Montero Laura & Steinkellner Herta, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 1-8 (2018). doi: 10.3389/fbioe.2018.00081).

Dado que esta estructura específica de plantas puede formar un determinante inmunogénico en proteínas terapéuticas recombinantes, se ha desarrollado una estrategia que permite humanizar la vía de la *O*-glicosilación en plantas mediante el silenciamiento del gen codificante de la enzima P4H, lo que permite remover eficientemente este tipo de modificación sobre los péptidos recombinantes (Parsons *et al.* 2013). En este sentido, actualmente se disponen de diversas alternativas que permiten manipular la vía secretora de plantas, con el propósito de producir péptidos recombinantes con patrones de glicosilación lo más parecido al de su contraparte mamífero (FIGURA 6), y evitar de esta forma el riesgo de incorporar glicanos inmunogénicos propios de células vegetales en las proteínas heterólogas.

Un número importante de vacunas candidatas basadas en glicoproteínas se han expresado exitosamente en plantas, dentro de éstas se encuentran anticuerpos y antígenos relacionados con enfermedades humanas de alto impacto, como son, la inmunodeficiencia ocasionada por el VIH, las influenzas estacionales producidas por los virus de la gripe, así como el dengue, la fiebre Zika, la fiebre amarilla, la fiebre del Nilo, éstas últimas ocasionadas todas por virus del género *Flavivirus*.

La glicoproteína de la envoltura del VIH, por ejemplo, es una molécula altamente glicosilada (Carter & Saunders 2007), la cual experimenta un clivaje proteolítico por una Furin proteasa durante su translocación a lo largo de la vía secretora para producir dos polipéptidos triméricos denominados gp41 y gp120, que representan las glicoproteínas de membrana de este virus (Decroly *et al.* 1994, Vollenweider *et al.* 1996). La maduración proteolítica del polipéptido precursor gp 160 es un requisito para que adopten la estructura cuaternaria funcionalmente correcta. En este sentido, se debe considerar que los epítopes inmunogénicos de las gp41 y gp120 contra los cuales se desarrollan anticuerpos neutralizantes, están altamente glicosilados y además se encuentran estéricamente inaccesibles previo al proceso de clivaje. Por esta razón se han propuesto diversos trabajos que emplean la expresión transitoria mediada por vectores de virus de plantas, de determinados epítopes ubicados en el domino V3 de la gp 120 y del epítope conservado ELDKWAS de la gp41 (Yusibov *et al.* 1997, Marusic *et al.* 2001). Estudios preclínicos más recientes reportaron la producción de anticuerpos neutralizantes contra la proteína de la envoltura viral sin clivar (Georgiev *et al.* 2015, Sharma *et al.* 2015), los cuales han servido como punto de partida para expresar en plantas glicoformas triméricas de gp160 no clivadas para estudios de inmunogenicidad (Margolin *et al.* 2019).

Otra glicoproteína utilizada con este enfoque, es la hemaglutinina (HA) presente en la envoltura viral de los virus responsables de ocasionar las influenzas estacionales a nivel mundial. Al igual de lo que ocurre para VIH con su proteína de envoltura, para los influenzavirus también es necesario que la glicoproteína HA experimente un proceso de glicosilación y de un clivaje proteolítico mediado por endoproteasas celulares, para que adquiera su estatus de virus infectivo (Margolin *et al.* 2018). En plantas la expresión de este polipéptido se ha reportado en sus tres glicoformas; es decir, como precursor inmaduro no clivado Ho (Mortimer *et al.* 2012), y como péptido maduro mostrando el dominio externo de membrana HA1 y el dominio transmembranal HA2 (Le Mauff *et al.* 2015). Estos requisitos, bioquímicamente necesarios, son aspectos que la ingeniería genética de plantas debe tener en

consideración cuando se propone desarrollar una estrategia de producción de proteínas heterólogas basadas en cualquier sistema de expresión, ya sea estable o transitoria.

TECNOLOGÍA DE LAS VLPs

Las partículas parecidas a virus, por sus siglas en inglés VLP (*Virus-Like Particle*), consisten de proteínas virales derivadas de las proteínas estructurales de un virus, las cuales se ensamblan apropiadamente simulando las características morfológicas del virión. Estas proteínas están acopladas o embebidas en una bicapa lipídica que proviene, bien de la membrana de la célula infectada o de una bicapa construida artificialmente, como por ejemplo un liposoma (FIGURA 7). Dentro de las características que hacen de las VLPs una herramienta biotecnológica interesante para la producción de fármacos, se puede señalar que al no poseer ácido nucleico se comportan como unidades no infecciosas, mejoran la captación de antígenos por el sistema inmune de mucosa, inducen fuerte respuesta inmune y proporcionan protección completa, pueden purificarse más fácilmente y poseen proteínas de cápside capaces de auto-ensamblarse de manera espontánea y estable dentro de VLPs, como ocurre por ejemplo, con el virus de la hepatitis B (Hepadnavirus), el virus de Norwalk (Calicivirus), el virus de la diarrea murina (Rotavirus), el virus del papiloma humano (Papilomavirus) y el virus de la gripe (Orthomixovirus) (O`Brien 2000, D´Aoust *et al.* 2010, Pillet *et al.* 2015, Marsian y Lomonossoff 2016, Pillet *et al.* 2016, González *et al.* 2018, MEDICAGO, 2018).

Dentro de la tecnología de los vectores virales para la producción de VLPs, el antígeno del core del virus de la hepatitis B (HBcAg) representa una de las primeras partículas producidas por expresión transitoria en plantas. La expresión de una forma monomérica del HBcAg se ensambló espontáneamente formando partículas como el core nativo, las cuales mostraron una fuerte inmunogenicidad asociada a su forma; es decir, relacionada con la estructura de sus espículas y con la presentación repetitiva de los determinantes antigénicos sobre su superficie (Mechtcheriakova *et al.* 2006). Así mismo, se ha establecido una plataforma en plantas para la producción de VLPs portando la glicoproteína hemaglutinina del influenzavirus A. Actualmente esta vacuna candidata, considerada una de las demostraciones más importantes de la agricultura molecular de plantas, se expresa en cantidades cercanas a los 50 mg/Kg de peso fresco foliar, unos niveles de rendimiento inusualmente altos para este tipo de sistema heterólogo (D´Aoust *et al.* 2008, Margolin *et al.* 2018). Este trabajo pionero, propiedad de la trans-nacional *Medicago Inc.*, ha proporcionado hasta este momento la única glicoproteína de origen viral evaluada en humanos (Pillet *et al.* 2016) y sujeta a aprobación por la FDA para ser liberada en el año 2020 como vacuna contra la influenza.

Estos alcances, producto de la cohesión de ramas de las ciencias tan disimiles como son la biología molecular e ingeniería genética de plantas, la virología clásica y molecular, la inmunología, la tecnología farmacéutica y la botánica clásica, representan un hito para la industria farmacéutica actual y para la salud y el bienestar humano, ya que con los mismos se espera producir las vacunas necesarias para paliar la problemática ocasionada por las enfermedades infecto-contagiosas más comunes presentes a nivel mundial.

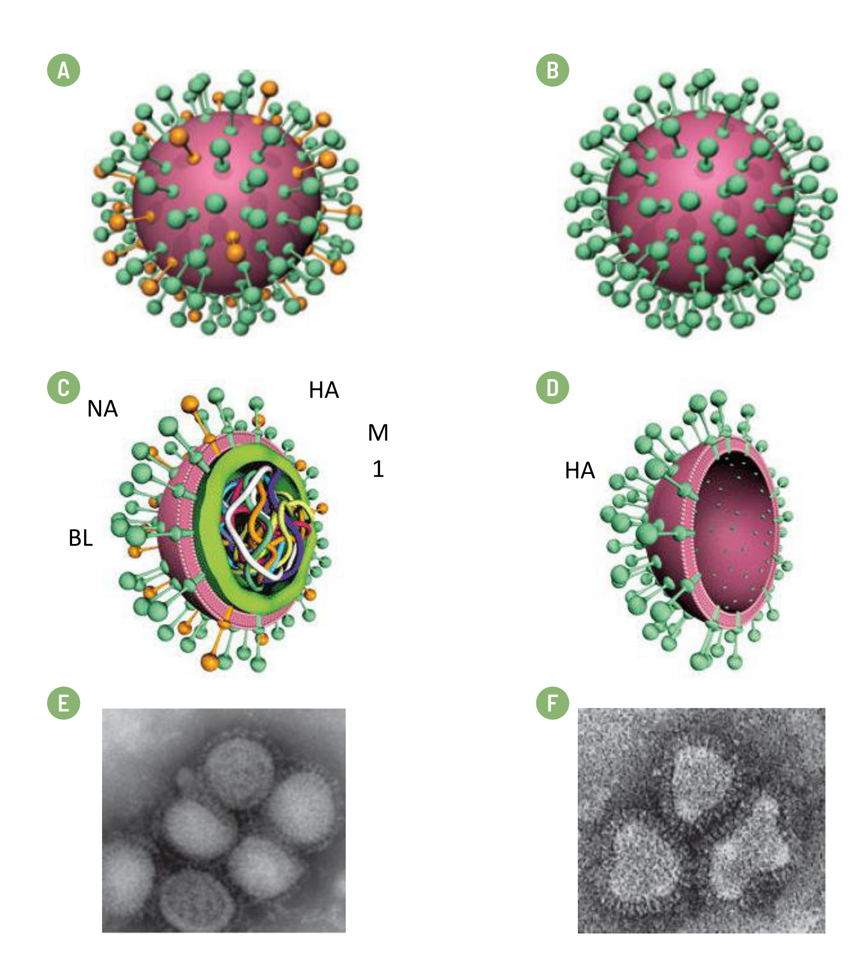


FIGURA 7. Representación esquemática de la forma *in vivo* del virus de la influenza y de su VLP. Se comparan las características externas de la partícula viral (A) y la VLP (B). Se muestran las proteínas estructurales de la envoltura de un virión *in vivo*, denominadas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), la bicapa lipídica (BL) que proviene de la membrana plasmática de la célula hospedera y que se adosa sobre la partícula viral durante el proceso de gemación, y la proteína de matriz (M1) que proporciona la estructura interna del virión (C). Se observa la estructura de una VLP portando sólo la proteína estructural HA (D). Esta última se desarrolló utilizando la tecnología propuesta por *Medicago Inc.*, empleando vectores virales inoculados en plantas de *N. benthamiana*. Se muestran una partícula viral silvestre (E) y una partícula como virus (F) a través de microscopía electrónica de transmisión (D´Aoust, Marc-André et al., *Plant Biotechnology Journal*, 8(5), 607-19 (2010), doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00496.x).

CONCLUSIONES

1. La producción de fármacos en plantas es una tecnología promisoria y de interés creciente en la industria farmacéutica actual para el desarrollo de vacunas.
2. Las plantas representan una plataforma económicamente viable y segura para el desarrollo de vacunas de interés terapéutico en humanos.

3. La vía secretora de plantas proporciona una alternativa apropiada para expresar péptidos recombinantes con patrones de glicosilación muy parecidos al encontrado en proteínas de origen animal.
4. La amplia variedad de VLPs producidas en plantas ha inducido el desarrollo exitoso de un mecanismo de respuesta inmune protectivo en los modelos animales evaluados.
5. Dentro de los criterios considerados por las empresas farmacéuticas para adoptar la estr-ategia de producción de proteínas recombinantes basada en el sistema de expresión mediado por vectores virales, se encuentran, factibilidad y rendimiento económico, ma-yor producción y rendimiento de la proteína de interés (≥ 1% de proteínas solubles totales), posibilidad de proyectar la producción a gran escala en un período corto de tiempo, demanda de infraestructura con niveles de bioseguridad no tan estrictos, y por último pero no menos importante, que el péptido heterólogo, ya sea vacuna, anti-cuerpo o antígeno, sea altamente inmunogénico y que proporcione inmunidad a largo plazo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADRI, M., RIVARD, D., COENEN, K., MICHAUD, D. 2009. Unintended molecular interactions in transgenic plants expressing clinically useful proteins: The case of bovine aprotinin traveling the potato leaf cell secretory pathway. *Proteomics*, 9: 746-56.

BOUTON, C., KING, C., CHEN, H., AZHAKANANDAM, K., BIERI, S., KOSACK, K., KANYUKA. 2018. Foxtail mosaic virus: A viral vector for protein expression in cereals. *Plant Physiology*, doi: https://doi.org/:10.1104/pp.17.01679.

CAÑIZARES, M., NICHOLSON, L., LOMONOSSOFF G. 2005. Use of viral vector for vaccine production in plants. *Immunol Cell Biol*, 83: 263-70.

CARTER, J., SAUNDERS, V. 2007. *Virology: Principles and Application*s. UK: John Wiley & Sons Ltd.

D´AOUST, M., LAVOIE, P., COUTURE, M., TREPANIER, S., GUAY, J., DARGIS, M., MONGRAND, S., LANDRY, N., WARD, B. VEZINA, L. 2008. Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice. *Plant Biotechnology Journal*, 6(9): 930-40. doi: 10.1111/j.1467-7652.2008.00384.x.

D´AOUST, M., COUTURE, M., CHARLAND, N., TRÉPANIER, S., LANDRY, N., ORS, F., VÉZINA, L. 2010. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnology Journal*, 8(5), 607-19: doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00496.x.

DENNIS, S., MEYERS, A., GUTHRIE, A., HITZEROTH, I., RYBICKI, E. 2018. Immunogenicity of plant-produced African horse sickness virus-like particles: implications for a novel vaccine. *Plant Biotechnology Journal*, 16(2): 442-50. doi: 10.1111/pbi.12076.

DECROLY, E., VANDENBRANDEN, M., RUYSSCHAERT, J., COGNIAUX, J., JACOB, G., HOWARD, S., MARSHALL, G., KOMPELLI, A., BASAK, A., JEAN, F. 1994. The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-I TM). *J Biol Chem*, 269(16): 12240-7.

DONINI, M., LICO, CH., BASCHIERI, S., CONTI, S., MAGLIANI, W., POLONELLI, L., BENVENUTO E. 2005. Production of an engineered killer peptide in Nicotiana benthamiana by using a Potato Virus X expression system. *Appl Environ Microbiol*, 71(10): 6360-7.

DORAN, P. 2000. Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr. Opin. Biotechnol*, 11: 199-204.

FAUQUET CM, MAYO MA, MANILOFF J, DESSELBERGER U, BALL LA. 2005. *Virus taxonomy, eighth report of the International Comittee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, California: Elseiver Academic Press.

FOLIMONOV, A., FOLIMONOV, S., BAR-JOSEPH, M., DAWSON, W. 2007. A stable RNA virus–based or citrus trees. *Virology*, 368: 205-16.

GEORGIEV, I., JOYCE, M., YANG, Y., SASTRY, M., ZHANG, B., BAXA, U., CHEN, R., DRUZ, A., LEES, C., NARPALA, S., SCHON, A., VAN GALEN, J., CHUANG, G., GORMAN, J., HARNED, A., PANCERA, M., STEWART, G., CHENG, C., FREIRE, E., MCDERMOTT, A., MASCOLA, J. KWONG, P. 2015. Single-Chain Soluble BG505.SOSIP gp140 Trimers as Structural and Antigenic Mimics of Mature Closed HIV-1 *Env. J Virol*, 89(10): 5318-29.

GLEBA, Y., MARILLONNET, S., KLIMYUK, V. 2004. Engineering viral expression vectors for plants: the "full virus" and the "deconstructed virus" strategies. *Curr. Opin. Plant Biol.,* 7(2): 182-8.

GONZÁLEZ, C., ACERO, G., GARCÍA, Y., URIBE, C., VÁZQUEZ, V., CARRILLO, M., GEVORKIAN, G., GÓMEZ, M. 2018. Plant-based chimeric HPV-virus-like particles bearing amyloid-β epitopes elicit antibodies able to recognize amyloid plaques in APP-tg mouse and Alzheimer's disease brains. *Inflammopharmacology*, 26(3): 817-27. doi: 10.1007/s10787-017-0408-2.

HEFFERON, K. 2012. Plant virus expression vectors set the stage as production platforms for biopharmaceuticals proteins. *Virology*, 433: 1-6.

HELEINIUS, A., AEBI, M. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291: 2364-9.

HELLWIG, S., DROSSARD, J., TWYMAN, R., FISCHER, R. 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat. Biotechnol,* 22(11): 1415-22.

HOOYKAAS, P., SCHILPEROORT, R. 1992. Agrobacterium and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol,* 19: 15-38.

HUSK, A., HAMORSKY, K., MATOBA, N. 2014. Monoclonal antibody purification (Nicotiana benthamiana Plants). *Bio Protoc.*, 4(2): 1-7.

KACHOIE, E., BEHJATNIA, S., KHARAZMIN, S. 2018. Expression of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) coat protein genes in plants using cotton leaf curl Multan betasatellite-based vector. *PLos One*, 13(1): 1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0190403.

KAGALE, S., UZUHASHI, S., WIGNESS, M., BENDER, T., YANG, W., HOSSEIN, M., ROZWADOWSKI, K. 2012. TMV-Gate vectors: Gateway compatible tobacco mosaic virus based expression vectors for functional analysis of proteins. *Scientific Reports*, 874(2): 1-10. doi: 10.1038/srep00874.

KLIMYUKA, V., POGUE, G., HERZ, S. BUTLER, J., HAYDON, H. 2014. Production of recombinant antigens and antibodies in Nicotiana benthamiana using "magnifection" technology: GMP-compliant facilities for small-and large-scale manufacturing. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 375: 127-54.

KO, K., KOPROWSKI, H. 2005. Plant biopharming of monoclonal antibodies. *Virus Res*, 111(1): 93-100.

KO, K., BRODZIK, R., STEPLEWSKI, Z. 2009. Production of antibodies in plants: approaches and perspectives. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 332: 55-78.

KOMAROVA, T., BASCHIERI, S., DONINI, M., MARUSIC, C., BENVENUTO, E., DOROKHOV, Y. 2010. Transient expression systems for plant–derived biopharmaceuticals. *Expert Rev Vaccines*, 9(8): 859-76.

LE MAUFF., MERCIER, G., CHAN, P., BUREL, C., VAUDRY, D., BARDOR, M., VEZINA, L.P., COUTURE, M., LEROUGE, P. LANDRY, N. 2015. Biochemical composition of haemagglutinin-based influenza virus-like particle vaccine produced by transient expression in tobacco plants. *Plant Biotechnol. J*, 13(5): 717-25.

LICO, CH., SANTI, L., TWYMAN, R., PEZZOTTI, M., AVESANI, L. 2012. The use of plants for the production of therapeutic human peptides. *Plant Cell Rep*, 31: 439-51.

MA, J., DRAKE, P., CHRISTOU, P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat. Rev. Genet*, 4(10): 794-805.

MARDANOVA, E., BLOKHINA, E., TSYBALOVA, L., PEYRET, H., LOMONOSSOFF, G., RAVIN, N. 2017. Efficient transient expression of recombinant proteins in plants by the novel pEff vector base on the genome of Potato Virus X. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1-8. doi: 10.3389/fpls.2017.00247.

MARGOLIN, E., CHAPMAN, R., WILLIAMSON, A., RYBICKI, E., MEYERS, A. 2018. Production of complex viral glycoprotein in plants as vaccine immunogens. *Plant Biotechnol. J*. doi: 10.1111/pbi.12963.

MARGOLIN, E., CHAPMAN, R., MEYERS, A., VAN DIEPEN, M., XIMBA, P., HERMANUS, T., CROWTHER, C., WEBER, B., MORRIS, L., WILLIAMSON, A., RYBICKI, E. 2019. Production and immunogenicity of soluble plant-produced HIV-1 subtype C envelope gp 140 immunogens. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2019.01378.

MARSIAN, J., LOMONOSSOFF, G. 2016. Molecular pharming-VLP made in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 37: 201-6. doi: 10.1016/j.copbio.2015.12.007.

MARUSIC C., RIZZA, P., LATTANZI, L., MANCINI, C., SPADA, M., BELARDELLI, F., BENVENUTO, E., CAPONE I. 2001. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Viro*l, 75(18): 8434-9.

MARUSIC, C., NUTTALL, J., BURIANI, G., LICO, CH., LOMBARDI, R., BASCHIERI, S., BENVENUTO, E., FRIGERIO, L. 2007. Expression, intracellular targeting and purification of HIV Nef variants in tobacco cells. *Biomed Central Biotechnol*, 7: 1-12.

MARUSIC, C., VITALE, A., PEDRAZZINI, E., DONINI, M., FRIGERIO, L., BLOCK, R., DIX, PH., MCCABE, M., BELLUCCI. M., BENVENUTO E. 2009. Plant-based strategies aimed at expressing HIV antigens and neutralizing antibodies at high levels. Nef as a case study. *Transgenic Res*, 18(4): 499-512. doi: 10.1007/s11248-009-9244-5.

MECHTCHERIAKOVA, I., ELAROV, M., NOCHOLSON, L., SHANKS, M., SKRYYABIN, K., LOMONOSSOFF, G. 2006. The use of viral vectors to produce hepatitis B virus core particles in plants. *J. Virol. Methods*, 131(1): 10-5.

MEDICAGO. 2018. *Medicago Technologies*. Quebec, Canadá.: Recuperado de http://medicago.qcqlan.com/medicago-vlps/.

MONTERO, L., STEINKELLNER, H. 2018. Advanced plant-based glycan engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 1-8. doi: 10.3389/fbioe.2018.00081.

MORTIMER, E., MACLEAN, J., MBEWANA, S., BUYS, A., WILLIAMSON, A., HITZEROTH, I. RYBICKI, E. 2012. Setting up a platform for plant-based influenza virus vaccine production in South Africa. *BMC Biotechnol*, 12, 14. doi: 10.1186/1472-6750-12-14.

NOGUERA, A., FERMÍN, G. 2013. Plataformas de expresión en plantas de péptidos humanos terapéuticos: expresión transitoria y estable. *Avances en Biomedicina*, 2:137-53.

O`BRIEN, G., BRYANT, C., CHARLOTTE, V., GREENBERG, H., GARDNER, R., BELLAMY, A. 2000. Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in Nicotiana benthamiana coats PVX rods and also assembles into virus like particules. *Virology*, 270(2): 444-53.

PARSONS, J., ALTMANN, F., GRAF, M., STADLMANN, J., RESKI, R., DECKER, E. 2013. A gene responsable for prolyl-hydroxylation of moss-produced recombinant human erythropoietin. *Sci. Rep*, 3. doi: 10.1038/srep03019.

PEYRET, H., LOMONOSSOFF, G. (2015). When plant virology met Agrobacterium: the rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnology Journal,* 13(8): 1121-35.

PILLET, S., RACINE, T., NFON, C., DI LENARDO, T., BABIUK, S., WARD, B., KOBINGER, G., LANDRY, N. 2015. Plant-derived H7 VLP vaccine elicits protective immune response against H7N9 influenza virus in mice and ferrets. *Vaccine*, 33(46): 6282-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.09.065.

PILLET, S., AUBIN, É., TRÉPANIER, S., BUSSIÈRE, D., DARGIS, M., POULIN, J., YASSINE, B., WARD, B., LANDRY, N. 2016. A plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine induces cross-reactive antibody and T cell response in healthy adults. *Clinical Immunology*, 168: 72-87.

SAINSBURY, F., LOMONOSSOFF, G. 2009. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 7(7): 682-93. doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00434.x.

SHARMA, S., DE VAL, N., BALE, S., GUENAGA, J., TRAN, K., FENG, Y., DUBROVSKAYA, V., WARD, A. WYATT, R. 2015. Cleavage-independent HIV-1 Env trimers engineered as soluble native spike mimetics for vaccine design. *Cell Rep*, 11(4): 539-50.

THUENEMANN, E., MEYERS, A., VERWEY, J., RYBICKI, E., LOMONOSSOFF, G. 2013. A method for rapid production of heteromultimeric protein complexes in plants: assembly of protective bluetongue virus-like particles. *Plant Biotechnology Journal*, 11(7), 839-46. doi: 10.1111/pbi.12076.

VALDERRAMA, A., ISAZA, R., KAFURI, L. 2005. Transformación de plantas mediada por Agrobacterium: "Ingeniería genética natural aplicada". *Rev Fac Nal Agr Medellín*, 58(1): 2569-85.

VERCH, T., YUSIBOV, V., KOPROWSKI, H. 1998. Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *Journal of Immunological Methods*, 220: 69-75.

VOLLENWEIDER, F., BENJANNET, S., DECROLY, E., SAVARIA, D., LAZURE, C., THOMAS, G., CHRETIEN, M., SEIDAH, N. 1996. Comparative cellular processing of the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein gp160 by the mammalian subtilisin/kexin-like convertases. *Biochem J*, 314(Pt 2): 521-32.

WANDELT, C., KHAN, M., CRAIG, S., SCHROEDER, H., SPENCER, D., HIGGINS, T. 1992. Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high level in the leaves of transgenic plants. *Plant J*, 2(2): 181-92.

WEBSTER, D., THOMAS, M. 2012. Post-translational modification of plant-made foreign proteins; glycosylation and beyond. *Biotechnol. Adv,* 30(2): 410-8. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.07.015.

XU, J., TAN, L., GOODRUM, K., KIELISZEWSKI, M. 2007. High-yields and extended serum half-life of human interferon α2b expressed in tobacco cells as arabinogalactan-protein fusions. *Biotechnol. Bioeng*, 97(5): 9971008.

XU, J., LAMPORT, D., SHOWALTER, A., KIELISZEWSKI, M. 2008. The O-Hyp glycosylation code in tobacco and Arabidopsis and a proposed role of Hyp-glycans in secretion. *Phytochemistry*, 69(8): 1631-40.

TAN, L., VARNAI, P., LAMPORT, D., YUAN, C., XU, J., QIU F., KIELISZEWSKI, M. 2010. Plant O-hydroxyproline arabinogalactans are composed of repeating trigalactosyl subunits with short bifurcated side chains. *J. Biol. Chem*, 285(32): 24575-83.

YUSIBOV, V., MODELSKA, A., STEPLEWSKI, K., AGADJANYAN, M., WEINER, D., HOOPER, D., KOPROWSKI, H. 1997. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies viruses and HIV–1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(11): 5784-8.